

ISOLEMENT DU VIRUS DE LA FRISOLÉE DES CITRUS^(*) (CRINKLY LEAF VIRUS)

I. Note préliminaire.

par **Danielle DAUTHY** et **J. M. BOVÉ**

*Service de Biochimie
Institut Français de Recherches Fruitières Outre-mer,
(Station de Physiologie végétale, C. N. R. A., Versailles, S-et-O).*

INTRODUCTION

Récemment, nous avons réussi à obtenir pour la première fois une préparation partiellement purifiée du virus de la Frisolée des Citrus en partant de *Vigna sinensis* inoculé mécaniquement avec un broyat des feuilles de citronniers infectés (DAUTHY et BOVÉ, 1963). Cette préparation, résultat de plusieurs cycles de centrifugation différentielle, se montrait infectieuse lorsqu'elle était inoculée mécaniquement à diverses espèces de Citrus ainsi qu'à *Vigna sinensis*. Cependant cette préparation ne nous avait pas permis d'observer la particule virale au microscope électronique.

En modifiant la technique de purification, nous venons maintenant d'observer des particules sphériques dans nos préparations infectieuses.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches de virus.

Nous avons utilisé, pour ce travail, les souches suivantes de Frisolée (Crinkly leaf virus) :

— Souche californienne 8I-A-65, de J. M. WALLACE, supposée pure ;

— Souche A. R. 33, trouvée en Corse (VOGEL et BOVÉ, 1963) ; l'arbre dont elle provient est également atteint de Psorose écailleuse, de Stubborn et d'Exocortis ;

ainsi que la souche de Panachure infectieuse (Infectious Variegation virus) floridienne de T. J. GRANT.

Ces souches ont été périodiquement repiquées sur agrumes en inoculant par greffages des morceaux d'écorce de plantes malades à des plants de semis

sains. Elles ont été transmises à *Vigna sinensis* par inoculation mécanique.

Matériel végétal.

1) Genre *Citrus*.

Les espèces suivantes du genre *Citrus* ont été utilisées : l'oranger, *Citrus sinensis* (L.), Osbeck, variété 'Hamlin' ; le citronnier *Citrus limon* (L.) BURM., deux variétés « acide » : 'Eureka' et 'Lisbonne' et une variété « doux » ; la Lime vraie à petits fruits, *Citrus aurantifolia* Sw. variété 'mexicaine' et le bigaradier : *Citrus aurantium* (L.).

Plusieurs plants de chaque espèce, sauf le bigaradier, ont été inoculés mécaniquement ou par greffage avec

(*) Manuscrit reçu le 20 avril 1964.

l'une ou l'autre des souches de virus. Des plants non inoculés ont servi de témoin.

Pour les travaux d'isolement du virus, ont été utilisées des feuilles jeunes et tendres manifestant des symptômes sévères de Frisolée ou de Panachure infectieuse, suivant le cas. Des feuilles de même âge, prises sur des plantes saines, ont subi les mêmes traitements.

2) *Vigna sinensis*.

La variété 'Blackeye' a été utilisée. Les plantes ont été inoculées mécaniquement au stade des deux feuilles cotylédonaire avec du jus de feuilles de citronnier manifestant des symptômes sévères de Panachure infectieuse.

Toutes les plantes utilisées dans ce travail ont été cultivées en serre.

Des citronniers 'Eureka' et 'Lisbonne', des orangers 'Hamlin', ainsi que des plants de *Vigna sinensis*, ont été utilisés pour les tests du pouvoir infectieux des préparations obtenues.

Pour les inoculations d'agrumes, il convient d'utiliser des feuilles jeunes, encore tendres, l'inoculation mécanique de feuilles trop cutinisées ne réussissant pas.

Fig. 1. (Photos a b c)

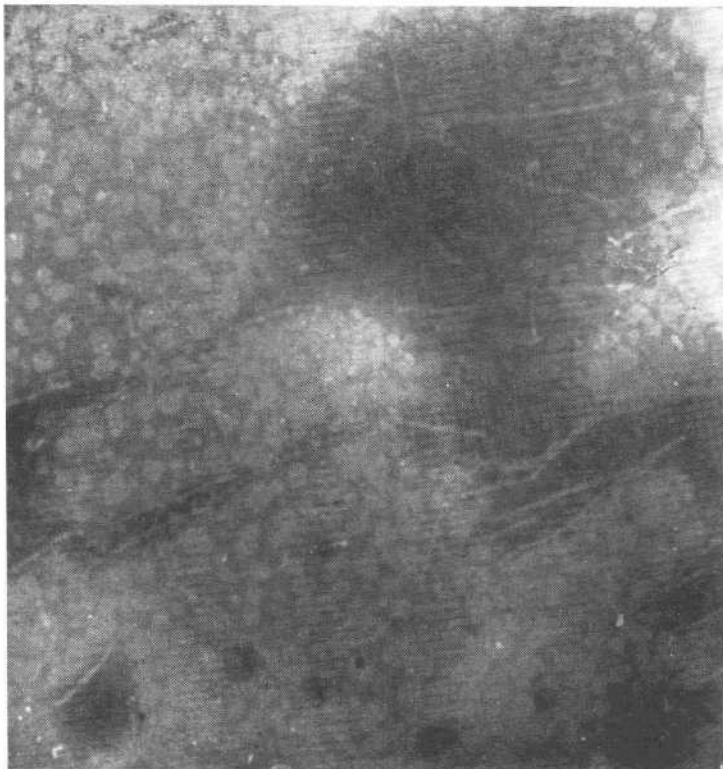
— Filaments flexueux de 7 m μ de diamètre dans des préparations provenant :

- a) de feuilles d'oranger 'Hamlin' sain ;
- b) de feuilles de lime 'mexicaine' saine ;
- c) de feuilles de bigaradier sain.

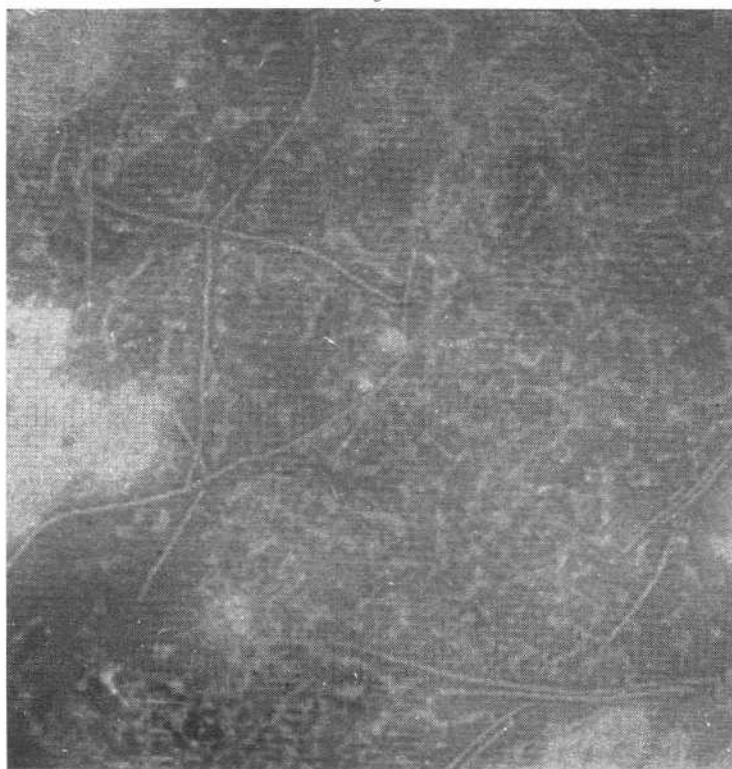
— grossissement 3 du microscope électronique.

— Tirage photographique : agrandissement 5/1.

a



b

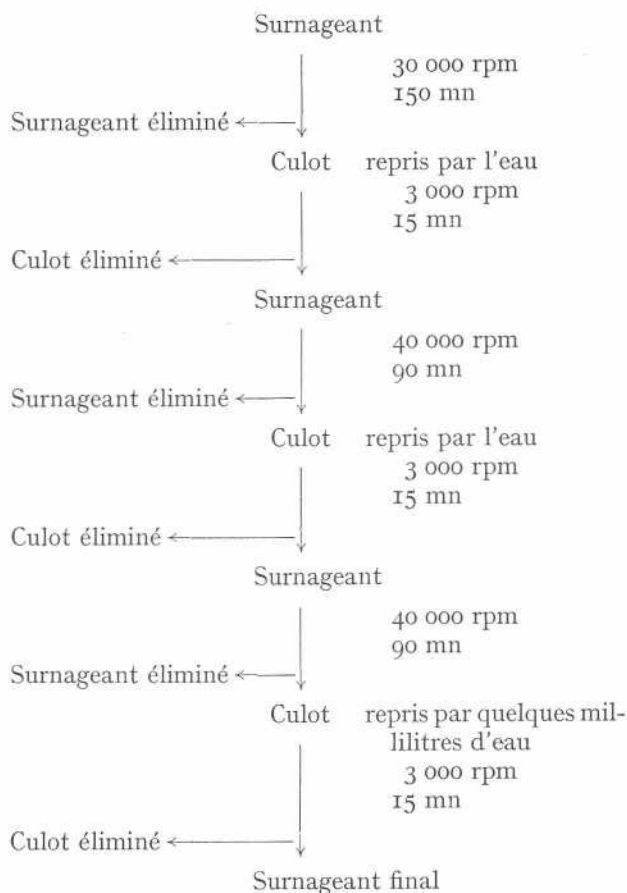


Méthode d'isolement.

Nous avons utilisé une méthode dérivée de celle de STEERE (1956).

50 à 100 g de feuilles de citronnier, d'oranger, de Lime 'mexicaine' ou de *Vigna sinensis* sont broyées pendant 1 à 2 mn dans un homogénéiseur Turmix, muni d'un bol de 1 l, avec un tampon phosphate de sodium 0,02 M, pH 8,0, contenant 400 mg d'ascorbate de sodium pour 100 ml. Deux ml de tampon à 1 ou 2° C ont été utilisés par gramme de feuilles à broyer. Le broyat est pressé à la main à travers deux épaisseurs de gaze ; le filtrat est émulsionné énergiquement à 4° C pendant 30 mn avec deux volumes d'un mélange butanol-chloroforme (1 v/1 v) au moyen d'un agitateur magnétique. La phase aqueuse est séparée de la phase organique et de la phase solide par centrifugation à 1 000 g pendant 30 mn à 10° C puis elle est laissée 15 à 16 h à la température du laboratoire. Les opérations suivantes sont effectuées aux alentours de 0° C. La phase aqueuse est centrifugée à 8 000 g pendant 30 mn. Le surnageant obtenu, limpide et d'une coloration jaune ambré, est soumis aux centrifugations suivantes, en utilisant pour les grandes vitesses une centrifugeuse Spinco modèle L munie du rotor 30 ou 40 et, pour les faibles vitesses, une centri-

fugeuse International, modèle HR-1, munie du rotor 860 :

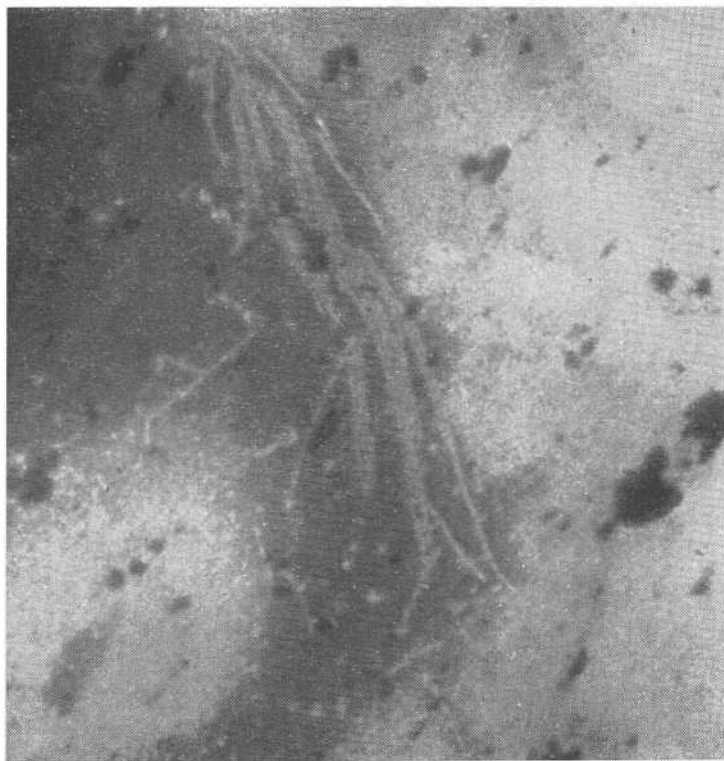


Le surnageant final est divisé en deux fractions ; l'une sert à l'inoculation des plantes-test pour déterminer le pouvoir infectieux, l'autre est destinée à l'examen au microscope électronique.

Cette méthode a été appliquée à des feuilles d'agrumes saines d'une part et manifestant des symptômes de Frisolée d'autre part. Elle a également été utilisée avec des feuilles de *Vigna sinensis* saines, d'une part et d'autre part atteintes de Panachure infectieuse, à la suite d'une inoculation mécanique de cette virose au moyen d'un broyat de feuilles de citronnier.

Microscope électronique.

La méthode à l'acide phosphotungstique a été utilisée pour la préparation des échantillons sur un support Carbone. L'examen a été réalisé au moyen d'un microscope électronique RCA EMU 3 B.

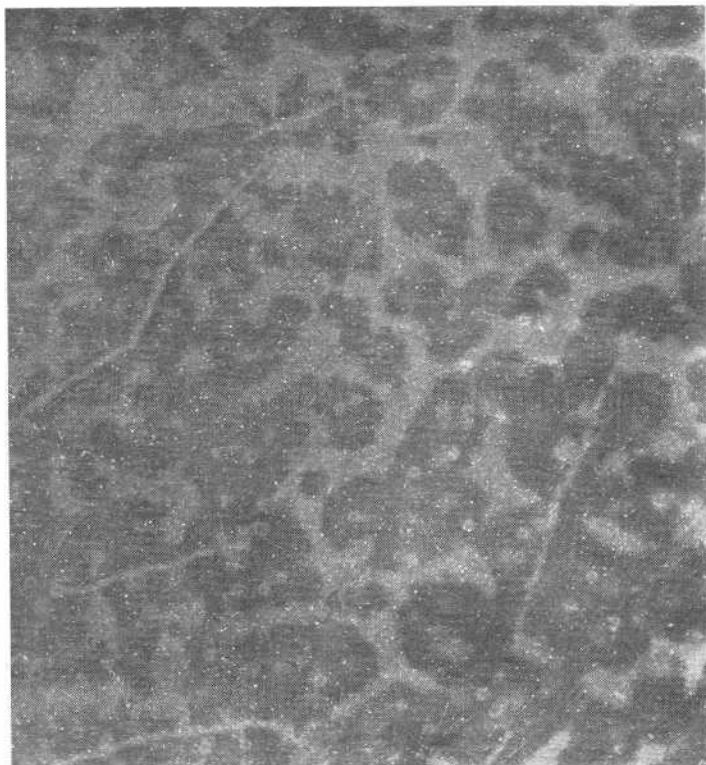


RÉSULTATS

La méthode de purification au butanol-chloroforme a été appliquée à des feuilles saines et à des feuilles atteintes de Frisolée des espèces suivantes : Lime 'mexicaine', Citronnier 'Lisbonne', Oranger 'Hamlin'. Des feuilles de bigaradiers sains ont également été utilisées. Les préparations obtenues ont été examinées au microscope électronique. Dans toutes les préparations, qu'elles proviennent de feuilles saines ou de feuilles virosées, on observe des filaments flexueux dispersés ou groupés, d'un diamètre d'environ 7 m μ (fig. 1 et 2). Ces filaments représentent probablement un constituant normal de l'espèce *Citrus*.

Dans les préparations obtenues à partir des feuilles virosées, on observe en outre la présence de particules sphériques, d'un diamètre de 13-14 m μ et dont le centre apparaît plus foncé sur les photographies (fig. 2 et 3).

FIG. 2. — Filaments flexueux de 7 m μ de diamètre et particules sphériques de 13-14 m μ de diamètre dans une préparation provenant de feuilles de citronnier atteintes de Frisolée (souche AR 33). Grossissement 4 du microscope électronique. Tirage photographique : agrandissement 5/1.



Toutes les préparations qui, au microscope électronique, ont révélé la présence de ces particules, se sont montrées infectieuses quand elles ont été inoculées mécaniquement à des Orangers 'Hamlin', à des Citronniers 'Lisbonne' et à des plants de *Vigna sinensis* (fig. 4 et 5).

Des feuilles de *Vigna sinensis* présentant des symptômes dus à la Panachure infectieuse ont également été soumises à la méthode de purification précédente. Les préparations obtenues renfermaient, elles aussi, des particules sphériques (*) et elles ont induit des symptômes de Panachure infectieuse à des Citronniers 'Lisbonne' inoculés mécaniquement.

(*) Corbett vient de trouver que le virus de la Panachure infectieuse est constitué par des particules sphériques de 33 m μ de diamètre.

FIG. 3. — Particules sphériques de 13-14 m μ de diamètre dans une préparation provenant de feuilles d'oranger atteintes de Frisolée (souche 81-A-65). Même grossissement et même agrandissement que pour la figure 1.



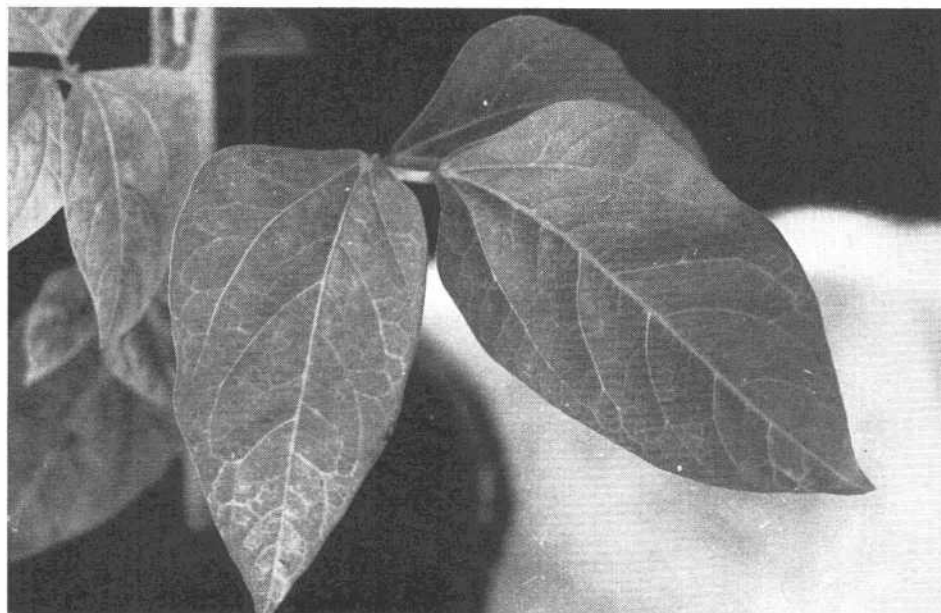


FIG. 5. — Éclaircissement des nervures dû à la Frisolée, sur feuilles de *Vigna sinensis* inoculé mécaniquement avec la préparation de la figure 3.

DISCUSSION

Les filaments que nous avons observés, aussi bien dans les préparations issues de feuilles d'agrumes saines que dans celles provenant de feuilles atteintes de Frisolée, correspondent vraisemblablement à ceux décrits par SILVA et OLIVERA (1963) et par KITAJIMA et coll. (1963). Ces filaments ont un diamètre de 7 μ . Nous les avons trouvés dans les quatre espèces de *Citrus* que nous avons examinées : Citronnier, Oranger, Lime 'mexicaine' et Bigaradier. Il semble que ces filaments constituent un composant normal des agrumes.

Jusqu'à présent, nous n'avons jamais observé les

particules sphériques de 13-14 μ dans les préparations provenant de feuilles saines ; nous les avons toujours trouvées dans les préparations purifiées à partir des feuilles d'agrumes atteintes de Frisolée. Dans tous les cas, seules les préparations contenant ces particules se sont révélées infectieuses.

Dans des expériences très récentes, nous avons soumis certaines préparations à des centrifugations en gradient de saccharose (Corbett, 1960). Avec les préparations issues des feuilles de Citronnier doux atteintes de Frisolée, nous avons observé dans le gradient de saccharose une bande de 2 à 3 mm de hauteur, très



FIG. 4. — Premiers symptômes de Frisolée sur feuille de citronnier inoculé mécaniquement avec la préparation de la figure 3.

riche en particules sphériques de 13 à 14 m μ (fig. 6); nous n'avons pas pu détecter ces particules dans les autres zones du gradient. Cette bande n'était pas présente dans les gradients correspondant aux préparations effectuées à partir de feuilles de Citronnier doux sain. Cette bande, caractéristique des préparations réalisées à partir de feuilles atteintes de Frisolée, s'est montrée infectieuse sur Citronnier doux.

Il semble donc très vraisemblable que les parti-

cules sphériques de 13-14 m μ de diamètre soient responsables du pouvoir infectieux et qu'elles représentent le virus de la Frisolée.

Cependant, même les préparations dans lesquelles nous observons une très forte majorité de particules sphériques renferment encore des éléments étrangers. Il est évidemment toujours possible de penser que le pouvoir infectieux puisse être associé à ces éléments étrangers. Des expériences sont en cours pour réfuter cet argument.

CONCLUSION

Il paraît très probable que les particules sphériques de 13-14 m μ de diamètre représentent le virus de la Frisolée. Dans ce cas, il s'agit de l'un des virus végétaux les plus petits connus à ce jour.

BIBLIOGRAPHIE

- CORBETT, M. K. 1960. — *Phytopathology*, 50 (1960), 346-351.
- DAUTHY, D. et BOVÉ, J. M. 1963. — Communication présentée au 3^e Congrès International de Virologie des Citrus. Campinas et Sao Paulo (Brésil), 16-26 septembre 1963.
- KITAJIMA, E. W., SILVA, D. M., OLIVEIRA, A. R., MULLER, G. W. et COSTA, A. S. 1963. — Communication présentée au 3^e Congrès International de Virologie des Citrus. Campinas et Sao Paulo (Brésil), 16-26 septembre 1963.
- SILVA, D. M. et OLIVEIRA, A. R. 1963. — Communication présentée au 3^e Congrès International de Virologie des Citrus. Campinas et Sao Paulo (Brésil), 16-26 septembre 1963.
- STEERE, R. L. 1956. — *Phytopathology*, 46 (1956), 60-69.
- VOGEL, R. et BOVÉ, J. M. 1963. — *Fruits*, 18 (1963), 115-121.

FIG. 6. — Particules sphériques de 13-14 m μ de diamètre dans une bande obtenue par centrifugation en gradient de saccharose à partir de feuilles de citronnier doux atteintes de Frisolée (souche 81-A-65).
Grossissement 3 du microscope électronique. Tirage photographique : agrandissement 4/1.



REMERCIEMENTS

Nous devons à l'obligeance de M. CORNUET d'avoir pu utiliser, à la Station de Pathologie Végétale, le microscope électronique du Centre National de Recherches Agronomiques.

Les examens au microscope électronique ont été réalisés par M^{me} MICHON. Qu'elle trouve ici nos remerciements chaleureux.

Nous remercions également M. VOGEL, de la Station Expérimentale d'Agrumiculture, pour de nombreux envois de matériel végétal.



PUBLICATION DE L'INSTITUT FRANÇAIS
DE RECHERCHES FRUITIÈRES OUTRE-MER (IFAC)

Vient de paraître :

MALADIES A VIRUS DES AGRUMES

Analyses des publications de 1926 à 1962

Bibliographie établie par

l'Institut français de Recherches fruitières Outre-Mer (IFAC)

Sous les auspices de

l'Organisation internationale des Virologistes des Agrumes (IOCV)

945 analyses - un index-matières - un index-auteurs

Prix : 50 francs.

I.F.A.C., 6, rue du Général-Clergerie, Paris, 16^e